بسم الله الرحمن الرحيم

دانشگاه علوم پزشکی اردبیل

دانشکده داروسازی

پایان نامه‌ی رساله‌ی دکتری عمومی داروسازی

عنوان:

طراحی یک واکسن پپتیدی بر پایه ذرات شبه ویروسی علیه سرطان سینه از طریق رویکردهای محاسباتی

استاد راهنما

دکتر نسیم حاجی قهرمانی

نگارش

فاطمه قاسم پور

شماره پایان نامه

د-۱۴۴

آبان ۱۴۰۱

تقدیم به:

پدر و مادر عزیزم؛

که وجودشان مظهر عشق و پاکی و بخشندگی است

و دوستان و استاد عزیزم؛ که روشنگر راهم بودند.

تقدیر و تشکر

شکر شایان نثار ایزد منان که توفیق را رفیق راهم ساخت تا این پایان نامه را به پایان برسانم. از استاد فاضل و اندیشمند سرکار خانم دکتر حاجی قهرمانی که همواره نگارنده را مورد لطف و محبت خود قرار داده اند، کمال تشکر را دارم.

چکیده فارسی

مقدمه: سرطان سینه به عنوان یکی از علل مهم مرگ و میر ناشی از سرطان در بین زنان در سراسر جهان است. از اینرو، یافتن یک درمان موثر برای این سرطان ضروری به نظر می‌رسد. ایمنی درمانی سرطان، به عنوان یک رشته‌ی نوظهور، نقش قابل توجهی در درمان سرطان سینه دارد. در میان استراتژی‌های مختلف در ایمنی درمانی سرطان، واکسن‌های پپتیدی نقش برجسته‌ای دارند. در مطالعه‌ی حاضر استراتژی‌های مختلفی برای طراحی یک واکسن کارآمد چند اپی توپی اجرا شد. استفاده از اپی توپ‌های لنفوسیت‌های T سیتوتوکسیک، لنفوسیت‌های T کمکی و یاور، سه جزء حیاتی در طراحی این واکسن پپتیدی بود.

مواد و روش کار: در مطالعه حاضر ابتدا توالی چهار آنتی ژن HER2، MUC1، Alpha lactalbumin و Mammaglobin-A و یاور MS2 استخراج شدند. شناسایی اپی توپ‌های القاکننده‌ی HTL و CTL توسط سرورهای مختلف انجام گرفت و آنتی ژنیسیته و آلرژنیسیته آن‌ها بررسی شد. بین اپی توپ‌های منتخب با MHC مربوطه داکینگ انجام گرفت. بهترین این اپی توپ‌ها به همراه یاور توسط لینکر GPGPG به هم متصل شدند. سپس، آلرژنیسیته، آنتی ژنیسیته، حلالیت و خصوصیات فیزیکوشیمیایی واکسن طراحی شده مورد بررسی قرار گرفت. اپی توپ‌های القاکننده لنفوسیت‌های B و IFN-γ شناسایی گردید. ساختار سه بعدی واکسن طراحی شد و بهینه سازی ساختار و در نهایت آنالیزهای اعتبار سنجی انجام گرفت.

نتایج: از طریق انتخاب اپی توپ‌های مناسب که آنتی ژن و غیر آلرژن بودند، واکسنی با طول ۵۵۶ آمینواسید به دست آمد. مطالعات آلرژنیسیته، آنتی ژنیسیته، حلالیت و خواص فیزیکوشیمیایی نشان داد که پروتئین غیر آلرژن، آنتی‌ژنیک، محلول و پایدار می‌باشد. همچنین مقایسه ساختار سه بعدی بهینه شده با مدل اولیه نشان داد ساختار سه بعدی بهتر شده و خطاهای احتمالی کاهش یافته است.

بحث و نتیجه گیری: در این پژوهش واکسنی زیرواحدی متشکل از ۱۸ اپی توپ برگرفته از چهار آنتی ژن و یاور MS2 طراحی شد. استفاده از یاور از نوع VLP در این مطالعه با ارائه‌ی بهتر آنتی ژن‌ها و القای پاسخ قوی لنفوسیت‌های B و T به کارآمدی بیشتر واکسن کمک می‌کند. بررسی خواص فیزیکوشیمیایی نشان می‌دهد که واکسن طراحی شده به طور بالقوه می‌تواند برای مصارف پیشگیرانه یا درمانی استفاده شود. با این حال مطالعات *in vivo* برای تشخیص کارایی واقعی واکسن ضروری است.

کلمات کلیدی: اپی توپ، بیوانفورماتیک، ذرات شبه ویروسی، سرطان سینه، واکسن

فهرست مطالب

عنوان **صفحه**

فصل اول: مقدمه

۱-۱- سرطان ۲

۱-۲- سیستم ایمنی ۲

۱-۲-۱- پاسخ ذاتی..... ۳

۱-۱-۲-۱- جذب نوتروفیل ۳

۲-۱-۲-۱- سیستم کمپلمان ۳

۳-۱-۲-۱- ائوزینوفیل‌ها..... ۳

۴-۱-۲-۱- ماست سل‌ها و بازوفیل‌ها..... ۳

۱-۲-۱-۵- سلول‌های کشنده‌ی طبیعی ۴

۶-۱-۲-۱- سیتوکین‌ها..... ۴

۷-۱-۲-۱- اینترفرون‌ها ۵

۲-۲-۱- ایمنی اختصاصی ۵

۱-۲-۲-۱- لنفوسیت‌های T ۵

۲-۲-۲-۱- لنفوسیت‌های B..... ۶

۱-۳- سرطان سینه ۷

۱-۴- اُنکودرایورها در سرطان سینه ۸

۱-۵- درمان سرطان سینه ۱۰

۱-۵-۱- مرحله صفر: در محل ۱۰

۱-۵-۲- مرحله ۱ و ۲: تهاجمی در مراحل اولیه ۱۱

۱-۵-۳- مرحله ۳: پیشرفته موضعی ۱۱

۱-۵-۴- مرحله ۴: متاستاتیک ۱۲

۱-۵-۵- سرطان سینه عودکننده..... ۱۳

۱۳ ..... ۶-۱- طراحی واکسن برای پیشگیری و درمان سرطان
۱۴ ..... ۱-۶-۱- واکسن‌های سلول تومور کامل (آلوژنیک، اتولوگ)
۱۴ ..... ۲-۶-۱- واکسن‌های سلول‌های دندریتیکی
۱۵ ..... ۳-۶-۱- واکسن‌های DNA
۱۵ ..... ۴-۶-۱- واکسن‌های بر پایه‌ی وکتور ویروسی
۱۶ ..... ۵-۶-۱- واکسن‌های پپتیدی
۱۶ ..... ۷-۱- یاورهای واکسن
۱۷ ..... ۱-۷-۱- نمک‌های معدنی
۱۷ ..... ۲-۷-۱- امولسیون‌ها
۱۸ ..... ۳-۷-۱- سیتوکین‌ها
۱۸ ..... ۴-۷-۱- مشتقات باکتریایی
۱۸ ..... ۵-۷-۱- نانو ذرات
۱۹ ..... ۸-۱- نانو واکسن‌ها
۱۹ ..... ۱-۸-۱- نانو ذرات پلیمری
۱۹ ..... ۲-۸-۱- نانو ذرات غیرآلی
۲۰ ..... ۳-۸-۱- نانو ذرات مبتنی بر لیپید
۲۰ ..... ۴-۸-۱- نانو ذرات پپتیدی خود ساخته (SAPNs)
۲۰ ..... ۵-۸-۱- نانو ذرات شبه ویروسی
۲۲ ..... ۹-۱- تاثیر بیوانفورماتیک در طراحی واکسن
۲۳ ..... ۱۰-۱- بررسی متون
۲۵ ..... ۱۱-۱- دلایل انتخاب موضوع
۲۶ ..... ۱۲-۱- اهداف و فرضیات
۲۶ ..... ۱-۱۲-۱- هدف کلی
۲۶ ..... ۲-۱۲-۱- اهداف اختصاصی
۲۶ ..... ۳-۱۲-۱- اهداف کاربردی

۴-۱۲-۱- فرضیات یا سوالات پژوهش ۲۶

فصل دوم: مواد، دستگاه‌ها و روش‌ها

۲-۱- مواد و تجهیزات مصرفی ۲۹
۲-۲- جمع آوری توالی‌ها ۳۰
۲-۳- جداسازی توالی‌های سیگنال پپتید ۳۱
۲-۴- انتخاب HLA مناسب ۳۱
۲-۵- آنالیزهای ایمونو انفورماتیک ۳۲
۲-۵-۱- شناسایی اپی توپ‌های متصل شونده به MHC I ۳۲
۲-۵-۲- شناسایی اپی توپ‌های متصل شونده به MHC II ۳۲
۲-۶- ارزیابی خواص اپی توپ‌ها ۳۳
۲-۶-۱- ارزیابی آنتی ژنیسیته ۳۳
۲-۶-۲- ارزیابی آلرژنیسیته ۳۴
۲-۷- طراحی شکل سه بعدی اپی توپ‌ها ۳۴
۲-۸- استخراج ساختار سه بعدی HLAها ۳۵
۲-۹- بهینه سازی ساختار HLAها ۳۵
۲-۱۰- بررسی کنش مولکولی ۳۶
۲-۱۱- پیش بینی اپی توپ‌های القا کننده اینترفرون گاما (IFN-γ) ۳۷
۲-۱۲- متصل کردن اپی توپ‌ها به یکدیگر ۳۷
۲-۱۳- طراحی ساختار نهایی واکسن ۳۸
۲-۱۴- ارزیابی ویژگی‌های واکسن ۳۸
۲-۱۴-۱- ارزیابی خواص فیزیکوشیمیایی واکسن ۳۸
۲-۱۴-۲- ارزیابی آنتی ژنیسیته واکسن ۳۹
۲-۱۴-۳- ارزیابی آلرژنیسیته واکسن ۳۹
۲-۱۴-۴- ارزیابی محلولیت واکسن ۳۹
۲-۱۵- پیش بینی اپی توپ‌های B-cell خطی و فضایی ۴۰

۲-۱۶- طراحی ساختار سه بعدی واکسن ۴۱
۲-۱۷- تصحیح ساختار سه بعدی به دست آمده ۴۱
۲-۱۸- ارزیابی ساختار سه بعدی ۴۲

فصل سوم: نتایج

۳-۱- تجزیه و تحلیل اولیه توالی‌های منتخب ۴۵
۳-۲- انتخاب HLA مناسب ۴۷
۳-۳- آنالیزهای ایمونو انفورماتیک ۴۹
۳-۳-۱- شناسایی اپی توپ‌های متصل شونده به MHC I ۴۹
۳-۳-۲- شناسایی اپی توپ‌های متصل شونده به MHC II ۴۹
۳-۴- ارزیابی خواص اپی توپ‌ها (آنتی ژنیسیته و آلرژنیسیته) ۴۹
۳-۵- طراحی شکل سه بعدی اپی توپ‌ها ۵۰
۳-۶- استخراج ساختار سه بعدی HLAها ۵۱
۳-۷- بهینه سازی ساختار HLAها ۵۲
۳-۸- بررسی کنش مولکولی ۵۴
۳-۹- پیش بینی اپی توپ‌های القا کننده‌ی اینترفرون گاما (IFN-γ) ۶۳
۳-۱۰- طراحی ساختار نهایی واکسن ۶۳
۳-۱۱- ارزیابی ویژگی‌های واکسن ۶۵
۳-۱۱-۱- ارزیابی خواص فیزیکوشیمیایی واکسن ۶۵
۳-۱۱-۲- ارزیابی آنتی ژنیسیته، آلرژنیسیته و محلولیت واکسن ۶۶
۳-۱۲- پیش بینی اپی توپ‌های B-Cell خطی و فضایی ۷۰
۳-۱۳- طراحی ساختار سه بعدی واکسن ۷۲
۳-۱۴- بهینه سازی ساختار سه بعدی ۷۲
۳-۱۵- ارزیابی ساختار واکسن طراحی شده ۷۳

فصل چهارم: بحث و نتیجه گیری

۴-۱- بحث ۷۸

۴-۲- نتیجه گیری ۸۳
۴-۳- پیشنهادات ۸۴
منابع ۸۵
پیوست‌ها ۹۰

فهرست علائم، نشانه‌ها و اختصارات

MHC: Major histocompatibility complex

CD4+: Cluster of differentiation 4

CD8+: Cluster of differentiation 8

Th: T helper

Tc: T cytotoxic

WHO: World health organization

DALYs: Disability-adjusted life years

HER2: Human epidermal growth factor receptor 2

PR: Progesterone receptor

ER: Estrogen receptor

EGFR: Epidermal growth factor receptor

ALN: Axillary lymph node

SLN: Sentinel lymph node

SERM: Selective estrogen receptor modulator

DCIS: Ductal carcinoma *in Situ*

LABC: Locally advanced breast cancer

TAA: Tumor associated antigen

HLA: Human leukocyte antigen

ATCV: Autologous tumor cell-based vaccine

PRR: Pattern recognition receptor

TLR: Toll like receptor

APC: Antigen presenting cell

PAMP: Pathogen associated molecular pattern

GM-CSF: Granulocyte-macrophage colony stimulating factor

CT: Cholera toxin

LT: Heat-labile enterotoxin

VLP: Virus like particle

ISCOM: Immune-stimulating complex

PLA: Polylactic acid

PLGA: Poly lactide-co-glycolide acid

PGA: Poly glutamic acid

SAPN: Self-assembled peptides nanoparticle

TCGA: The Cancer Genome Atlas

CTL: Cytotoxic T Lymphocyte

HTL: Helper T Lymphocyte

AFND: Allele frequency net data base

IEDB: Immune Epitope Database

NIAID: National Institute of Allergy and Infectious Diseases

ANN: Artificial Neural Network

SMM: Scoring Matrix-based Method

CombLib: Combinatorial Peptide Libraries

ACC: Automatic Cross-Covariance

QSAR: Quantitative Structure-Activity Relationship

PDB: Protein Data Bank

IFN-γ: Interferon-gamma

***loc*PREFMD**: Local Protein structure Refinement via Molecular Dynamics

PSVS: Protein Structure Validation Software

HPV: Human Papilloma Virus

فهرست جداول

عنوان **صفحه**

جدول ۲–۱- مجموع نرم افزارها و سرورهای مورد استفاده در پژوهش ۲۹

جدول ۳–۱- آلل‌های با فراوانی بالای ۱۰ درصد از جمعیت ایران رویان کُرد ۴۸

جدول ۳–۲- اپی‌توپ‌های آنتی ژن و غیرآلرژنی که شکل سه بعدیشان طراحی شد ۵۰

جدول ۳–۳- رتبه‌ی داکینگ اپی توپ‌های شناسایی شده از پروتئین‌های Alpha lactalbumin، HER2، Mammaglobin-A و MUC1 با گیرنده‌های A02، A24 و DRB1*04..... ۵۵

جدول ۳–۴- اپی توپ‌های نهایی انتخاب شده از پروتئین‌های Alpha lactalbumin، HER2، Mammaglobin-A و MUC1 بر اساس رتبه‌ی داکینگ ۵۷

جدول ۳–۵- شناسایی اپی توپ‌های القاکننده‌ی اینترفرون گاما با سرور IFNepitope ۶۳

جدول ۳–۶- توالی‌های مربوط به Spy Tag، Spy Catcher و VLP ۶۵

جدول ۳–۷- خواص فیزیکوشیمیایی ساختارهای طراحی شده برای واکسن ۶۶

جدول ۳–۸- محلولیت، آنتی ژنیسیته و آلرژنیسیته ساختارهای طراحی شده برای واکسن.....۶۷

جدول ۳–۹- توالی واکسن به همراه خواص فیزیکوشیمیایی آن ۶۹

جدول ۳–۱۰- B-Cell اپی‌توپ‌های خطی شناسایی شده از ساختار اول واکسن ۷۰

جدول ۳–۱۱- B-Cell اپی‌توپ‌های فضایی شناسایی شده از ساختار اول واکسن ۷۱

فهرست شکل‌ها

عنوان **صفحه**

شکل ۱–۱- نقش لنفوسیت‌های B و T در ایمنی اختصاصی ۷

شکل ۲–۱- روندنمای پژوهش ۴۳

شکل ۳–۱- منحنی سیگنال پپتید پروتئین‌های (الف) Alpha lactalbumin، (ب) HER2، (ج) Mammaglobin-A، (د) MUC1 ..... ۴۷

شکل ۳–۲- ساختار HLAهای (الف) A02، (ب) A24 و (ج) DRB1*04 قبل و بعد از حذف کمپلکس‌ها و لیگاندهای اضافی ۵۴

شکل ۳–۳- داکینگ گیرنده A02 با پپتیدهای مربوطه ۵۹

شکل ۳–۴- داکینگ گیرنده A24 با پپتیدهای مربوطه ۶۰

شکل ۳–۵- داکینگ گیرنده DRB1*04 با پپتیدهای مربوطه ۶۲

شکل ۳–۶- نحوه اتصال اجزای مختلف واکسن به یکدیگر ۶۴

شکل ۳–۷- شکل شماتیک واکسن طراحی شده ۷۰

شکل ۳–۸- ساختار سه بعدی واکسن که در دو رنگ مشخص شده است ۷۳

شکل ۳–۹- ارزیابی ساختار واکسن طراحی شده ۷۴

شکل ۳–۱۰- منحنی راماچاندران قبل از بهینه سازی از نظر پیوند فی (Φ) و سای (ψ) ۷۵

شکل ۳–۱۱- منحنی راماچاندران بعد از بهینه سازی از نظر پیوند فی (Φ) و سای (ψ) ۷۶